


PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : <div style="text-align: center; font-weight: bold; font-size: 1.2em;">C07K</div>	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/10258 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. März 1997 (20.03.97)		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border-right: 1px solid black; padding: 5px;"> (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/01567 (22) Internationales Anmeldedatum: 23. August 1996 (23.08.96) (30) Prioritätsdaten: <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 10px;"> 195 31 033.0 23. August 1995 (23.08.95) DE </div> (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): PROGEN BIOTECHNIK GMBH [DE/DE]; Maaßstrasse 30, D-69123 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FRANKE, Werner [DE/DE]; Landfriedstrasse 5, D-69117 Heidelberg (DE). SCHÄFER, Stephan [DE/DE]; Im Entenlach 33, D-69123 Heidelberg (DE). (74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE). </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> (81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i> </td> </tr> </table>			(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/01567 (22) Internationales Anmeldedatum: 23. August 1996 (23.08.96) (30) Prioritätsdaten: <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 10px;"> 195 31 033.0 23. August 1995 (23.08.95) DE </div> (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): PROGEN BIOTECHNIK GMBH [DE/DE]; Maaßstrasse 30, D-69123 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FRANKE, Werner [DE/DE]; Landfriedstrasse 5, D-69117 Heidelberg (DE). SCHÄFER, Stephan [DE/DE]; Im Entenlach 33, D-69123 Heidelberg (DE). (74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/01567 (22) Internationales Anmeldedatum: 23. August 1996 (23.08.96) (30) Prioritätsdaten: <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 10px;"> 195 31 033.0 23. August 1995 (23.08.95) DE </div> (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): PROGEN BIOTECHNIK GMBH [DE/DE]; Maaßstrasse 30, D-69123 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FRANKE, Werner [DE/DE]; Landfriedstrasse 5, D-69117 Heidelberg (DE). SCHÄFER, Stephan [DE/DE]; Im Entenlach 33, D-69123 Heidelberg (DE). (74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>			
(54) Title: ANTIBODIES AGAINST EPITOPES, EXPOSED ON SURFACES OF CANCER CELLS OUTSIDE DESMOSOMES, OF DESMOSOMAL CADHERINES (54) Bezeichnung: ANTIKÖRPER GEGEN AN OBERFLÄCHEN VON CARCINOM-ZELLEN AUSSERHALB VON DESMOSOMEN EXPONIERTE EPITOPE DESMOSOMALER CADHERINE (57) Abstract <p>The present invention relates to antibodies against parts of desmosomal cadherines, wherein the parts are also exposed on the surface of cells not connected by desmosomes. The invention also relates to processes for producing these antibodies and the use thereof.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft Antikörper gegen Teile von desmosomalen Cadherinen, wobei die Teile an der Zelloberfläche auch von nicht durch Desmosomen verbundenen Zellen exponiert sind. Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung solcher Antikörper sowie deren Verwendung.</p>				

BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Antikörper gegen an Oberflächen von Carcinom-Zellen außerhalb von Desmosomen exponierte Epitope desmosomaler Cadherine

Die vorliegende Erfindung betrifft Antikörper gegen Epitope desmosomaler Cadherine, die auf der Oberfläche von Zellen außerhalb von Desmosomen exponiert sind, insbesondere auch auf nicht durch Desmosomen verbundenen Carcinom-Zellen, Verfahren zur Herstellung solcher Antikörper und ihre Verwendung.

Zellen von Epithelgeweben und Carcinomen sind durch bestimmte Haftstrukturen miteinander verbunden, die als Desmosomen bezeichnet werden. Solche Desmosomen enthalten transmembrane Glykoproteine, die als desmosomale Cadherine bezeichnet werden. Beispiele solcher desmosomaler Cadherine sind Desmoglein 2 (Dsg2) und Desmocollin 2 (Dsc2).

Der Nachweis von metastasierenden Carcinomen ist schwierig. Oft enthalten Biopsieproben wie Punktate aus Knochenmark oder anderen Metastasen-verdächtigen Geweben oder Körperflüssigkeiten nur wenige Carcinom-Zellen, die unter einer Überzahl nicht-maligner Zellen übersehen werden. Damit ist eine quantitative und qualitative Beurteilung und Absicherung eines Befundes durch Untersuchung hinreichender Zahlen verdächtiger Zellen und mit verschiedenen Reagentien nicht möglich. Auch sind viele der zu untersuchenden Merkmale intrazellulär, was sie erst nach Aufbruch der Zellen für eine Nachweisreaktion zugänglich macht. Dies erfordert einen erheblichen Zeit- und Kostenaufwand, bzw. den Zell-Aufbruch, d.h. irreversiblen Verlust der Zellen für weitere biologische Untersuchungen.

Der Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit

- 2 -

dem metastasierende Carcinome schnell und zuverlässig nachgewiesen werden können.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände der Patentansprüche erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit Antikörper gegen Teile von desmosomalen Cadherinen, wobei diese Teile (Epitope) auch an der Zelloberfläche von nicht durch Desmosomen verbundenen Zellen exponiert sind.

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis der Anmelderin, daß an der Oberfläche von nicht durch Desmosomen verbundenen Zellen, insbesondere einzelnen Epithel- und Carcinom-Zellen sowie Mikrometastasen, Teile von desmosomalen Cadherinen exponiert sind, die bei durch Desmosomen verbundenen Zellen wie sie in normalen Geweben und in Carcinomen vorliegen, nicht oder in nur sehr geringem Ausmaß zugänglich sind. Gegen diese extrazellulär orientierten Teile, nachstehend als "Cad-ex"-Teile bezeichnet, hat die Anmelderin Antikörper hergestellt.

Die erfindungsgemäßen Antikörper sind gegen extrazelluläre Epitope desmosomaler Cadherine gerichtet, die im Verlauf des invasiven Karzinomwachstums in Form stabiler Molekülfragmente freigesetzt werden. Der Nachweis entsprechender Fragmente in Körperflüssigkeiten dient als Indiz für invasives und metastasierendes Karzinomwachstum. Benachbarte Zellen von normalen Epithelgeweben und davon abgeleiteten malignen Tumoren (Karzinomen) werden durch Haftstrukturen miteinander verbunden, die als Desmosomen bezeichnet werden. Die Zell-Zell-Haftung wird durch desmosomale Transmembran-Proteine vom Cadherin-Typ vermittelt. Man unterscheidet Desmogleine (Dsg) und Desmocolline (Dsc), die mit jeweils 3 genotypisch verschiedenen Isoformen in den verschiedenen Epithelgeweben gebildet werden.

Invasiv-destruktives Karzinomwachstum wird von ausgedehnten Proteolysen der extrazellulären Matrix an der Invasionsfront begleitet. Größtenteils durch Plasmin

- 3 -

aktivierte Matrixmetalloproteinasen besorgen den Abbau der extrazellulären Matrix. Karzinomzellen verlassen den Primärtumor, um nach Wanderung über Lymph- und Blutgefäße organferne Metastasen zu bilden. Aktivierte Proteasen spalten definierte, stabile Molekülfragmente der Desmogleine und Desmocolline von der Zelloberfläche ab, so daß diese anschließend in den Körperflüssigkeiten nachweisbar werden. Dieser Prozeß läuft bereits ab, bevor Primärtumor und gegebenenfalls vorhandene Metastasen klinisch-diagnostizierbare Symptome verursachen. Der laborchemische Nachweis solcher Molekülfragmente in Körperflüssigkeiten ermöglicht die Einleitung weiterer diagnostischer Maßnahmen zur Früherkennung eines Tumors.

Von den Anmeldern wurde herausgefunden, daß desmosomale Oberflächen-Antigene unter bestimmten Bedingungen, zum Beispiel auch unter der in vitro-Kultivierung von Epithelzellen, von der Zelloberfläche abgespalten und an den extrazellulären Raum abgegeben werden. Gegen diese Molekülfragmente sind die erfindungsgemäßen Antikörper gerichtet.

Die erfindungsgemäßen Antikörper können polyklonal oder monoklonal sein, wobei monoklonale Antikörper bevorzugt sind. Die Antikörper können aus Tieren oder dem Menschen erhalten sein, wobei für polyklonale Antikörper Meerschweinchen und Kaninchen und für monoklonale Antikörper Mäuse bevorzugt sind.

Ferner können die Antikörper synthetisch sein, wobei ihnen ggfs. Teile, die für die Erkennung von Cad-ex-Teilen desmosomaler Cadherine nicht notwendig sind, ganz oder teilweise fehlen, bzw. diese Teile durch andere ersetzt sind, die den Antikörpern weitere günstige Eigenschaften verleihen.

Bevorzugt werden Antikörper gegen die Desmogleine Dsg1, Dsg2 und Dsg3 sowie Desmocolline Dsc1, Dsc2 und Dsc3 eingesetzt. Die Epitope der Antikörper liegen in den extrazellulären Moleküldomänen, die bevorzugt den nachfolgend genannten Aminosäuresequenzbereichen entsprechen:

- 4 -

- Dsg1: beginnend mit dem Dekapeptid EWIKFAAACR
 endend mit dem Dekapeptid AKDLLSDNVH
- Dsg2: beginnend mit dem Dekapeptid AWITAPVALR
 endend mit dem Dekapeptid REAQHDSYVG
- Dsg3: beginnend mit dem Dekapeptid EWVKFAKPCR
 endend mit dem Dekapeptid TRYGRPHSGR
- Dsc1: beginnend mit dem Dekapeptid RWAPIPASLM
 endend mit dem Dekapeptid DKSTRDVRPN
- Dsc2: beginnend mit dem Dekapeptid RWAPIPCSMML
 endend mit dem Dekapeptid IGGGGVQLGK
- Dsc3: beginnend mit dem Dekapeptid RWAPIPCSMQ
 endend mit dem Dekapeptid PTQCRATSRS

In bevorzugter Ausführungsform sind die Antikörper gegen Cad-ex-Teile von Dsg2 gerichtet. Besonders bevorzugt sind Antikörper, deren Epitope innerhalb des Abschnitts von Dsg2 liegt, der durch die folgende Aminosäuresequenz I bestimmt ist.

```

AWITAPVALR EGEDLSKKNP IAKIHSDLAE ERGLKITYKY TGKGITEPPF
GIFVFNKTG ELNVTSLDR EETPFFLLTG YALDARGNNV EKPLELRIKV
LDINDNEPVF TQDVFGSVE ELSAAHTLVM KINATDADEP NTLNSKISYR
IVSLEPAYPP VFYLNKDTGE IYTTSVTLDR EEHSSYTLTV EARDGNGEVT
DKPVKQAQVQ IRILDVNDNI PVVENKVLEG MVEENQVNVE VTRIKVFDAD
EIGSDNWLAN FTFASGNEGG YFHIETDAQT NEGIVTLIKE VDYEEMKNLD
FSVIVANKAA FHDSIRSKYK PTPIPIKVKV KNVKEGIHFK SSVISIYVSE
SMRSSHKGQI IGNFQAFDED TGLPAHARYV KLEDRDNWIS VDSVTSEIKL
AKLPDFESRY VQNGTYTVKI VAISEDYPRK TITGTVLINV EDINDNCPTL
IEPVQTICHD AEYVNVTAED LDGHPNSGPF SFSVIDKPPG MAEKWKIARQ
ESTSVLLQQS EKKLGRSEIQ FLISDNQGFs CPEKQVLTLT VCEVLHGSGC
REAQHDSYVG

```

Ganz besonders bevorzugt sind Antikörper, deren Epitope innerhalb des durch die folgenden Aminosäuresequenz II von Dsg2 bestimmten Abschnitts liegt:

- 5 -

INDNEPVFTQDVFVGSVEELS AAHTLVMKIN ATDADEPNTL NSKISYRIVS
LEPAYPPVFY LNKDTGEIYT TSVTLDREEH SSYTLTVEAR DGNGEVTDKP
VKQAQVQIRI LDVNDNIPVV ENKVLEGMVE ENQVNVEVTR IKVFDADEIG
SDNWLANFTF ASGNEGGYFH IETDAQTNEG IVTLIKEVDY EEMKNLDFSV
IVANKAAFHK SIRSKYKPTP IPIKVKVKNV KEGIHFKSSV ISIVVSESMD
RSSKGQIIGN FQ

Solche Antikörper wurden bei der DSM als Antikörper

Dsg2-G11 unter DSM ACC 2226,

Dsg2-G91 unter DSM ACC 2227,

Dsg2-G96 unter DSM ACC 2228,

Dsg2-G129 unter DSM ACC 2229

am 9. August 1995 hinterlegt.

Der Antikörper Dsg2-G6 wurde unter DSM ACC 2236 am 20. September 1995 hinterlegt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die Antikörper gegen Cad-ex-Teile von Dsc2 gerichtet. Besonders bevorzugt sind Antikörper, deren Epitope in dem Aminosäuresequenz-Bereich von Dsc2 liegt, der mit dem Dekapeptid RWAPIPCSMML beginnt und dem Dekapeptid DCTHRVDPRI endet.

Erfindungsgemäße Antikörper können nach üblichen Verfahren hergestellt werden. Sollen polyklonale bzw. monoklonale Antikörper hergestellt werden, ist es günstig, Tiere, insbesondere Meerschweinchen und Kaninchen für erstere und Mäuse für letztere Antikörper mit einem desmosomalen Cadherin und/oder Fragmenten davon zu immunisieren. Der Ausdruck "Fragmenten davon" umfaßt auch synthetische Peptide, die Teilsequenzen von desmosomalen Cadherinen aufweisen. Vorteilhaft kann es auch sein, die Tiere mit einem Gemisch aus desmosomalen Cadherinen und/oder Fragmenten davon zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem oder den gleichen desmosomalen Cadherinen und/oder Fragmenten davon erfolgen. Auch können andere desmosomale Cadherine und/oder Fragmente davon oder eine Kombination aus diesen und dem oder den vorhergehenden desmosomalen Cadherinen und/oder Fragmenten

davon für "Booster" verwendet werden. Polyklonale Antikörper können dann aus dem Serum der Tiere erhalten werden. Für monoklonale Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert. Erhaltene Antikörper werden schließlich mit nicht durch Desmosomen verbundenen Zellen, insbesondere einzelnen Epithel- und Carcinom-Zellen sowie Mikrometastasen inkubiert, wodurch diejenigen Antikörper identifiziert werden, die Cad-ex-Teile von desmosomalen Cadherinen erkennen.

Beispielhaft wird die Herstellung von Antikörpern gegen Cad-ex-Teile von Dsg2 beschrieben. Hierzu werden aus Gewebe isoliertes oder rekombinant, z.B. in E.coli, tierischen Zellen oder Hefe, hergestelltes Dsg2 und/oder Fragmente davon zur Immunisierung von Tieren und für weitere "Booster" benutzt, z.B. ein Polypeptid von Dsg2, das zumindest teilweise innerhalb der Domänen EI, EII, EIII, EIV und EA von Dsg2 liegt, etwa die vorstehende Aminosäuresequenz I, ganz besonders die vorstehende Aminosäuresequenz II umfaßt. Dabei werden entweder glykosylierte oder nicht-glykosylierte Formen eingesetzt. Milzzellen werden den Mäusen entnommen und mit Myelomzellen fusioniert. Erhaltene monoklonale Antikörper werden mit einzelnen Epithel- und Carcinomzellen sowie Mikrometastasen inkubiert. Es werden so z.B. die folgenden, Cad-ex-Teile von Dsg2 ererkennenden monoklonalen Antikörper der IgG1-Klasse, Dsg2-G6, Dsg2-G11, Dsg2-G91, Dsg2-G96 und Dsg2-129 erhalten.

Zur Herstellung von synthetischen Antikörpern kann z.B. von vorstehenden monoklonalen Antikörpern ausgegangen werden. Hierzu bietet sich an, die Antigen-Bindungsregion der monoklonalen Antikörper zu analysieren und die für die spezifische Erkennung von Cad-ex-Teile eines desmosomalen Cadherins notwendigen und nicht-notwendigen Teile zu identifizieren. Die notwendigen Teile können dann modifiziert und die nicht-notwendigen Teile ganz oder teilweise eliminiert bzw. durch Teile ersetzt werden, die den Antikörpern weitere günstige Eigenschaften verleihen. Auch können Teile außerhalb der Bindungsregion der Antikörper modifiziert, eliminiert oder ersetzt werden. Der Fachmann weiß, daß sich für vorstehende Maßnahmen insbesondere die DNA-Rekom-

- 7 -

binationstechnologie eignet. Diese ist ihm bestens vertraut.

Erfindungsgemäße Antikörper zeichnen sich dadurch aus, daß sie Teile von desmosomalen Cadherinen erkennen, die an der freien Zelloberfläche von nicht oder nur teilweise durch Desmosomen verbundenen Zellen exponiert sind. Solche Zellen sind insbesondere einzelne Epithel- und Carcinomzellen sowie Mikrometastasen. Damit eignet sich die vorliegende Erfindung zum Nachweis dieser Zellen und Zellgruppen. Der Nachweis kann durch übliche Nachweisverfahren, insbesondere einem "Western Blot", einem ELISA, einer Immunpräzipitation oder durch Immunfluoreszenzmikroskopie, erfolgen. Hierzu können erfindungsgemäße Antikörper, wenn es angebracht ist, markiert sein oder in Kombination mit markierten, gegen sie gerichteten Antikörpern eingesetzt werden. Ferner können erfindungsgemäße Antikörper in einem Biosensor-Verfahren eingesetzt werden. Die Reaktion der erfindungsgemäßen Antikörper kann auf lebenden oder fixierten Zellen stattfinden.

Erfindungsgemäß werden auch Kits bereitgestellt, die erfindungsgemäße Antikörper zusammen mit Trägermaterialien und üblichen Hilfsstoffen wie Puffer enthalten.

Desweiteren eignen sich erfindungsgemäße Antikörper dazu, nicht durch Desmosomen verbundene Zellen, insbesondere einzelne Epithel- und Carcinom-Zellen sowie Mikrometastasen, bestehend aus wenigen, teilweise durch Desmosomen gekoppelten Carcinom-Zellen, in üblichen Zellsortierungsverfahren anzureichern, insbesondere durch FACS-Methoden oder durch übliche Immunadsorption an geeignete Träger wie beschichtete Kügelchen (Beads), wodurch diese weiteren diagnostischen Untersuchungen unterzogen bzw. für therapeutische Tests und Maßnahmen herangezogen werden können. Als Nachweisverfahren eignen sich z.B. Immunblot-Analysen oder ELISA.

Darüber hinaus eignen sich erfindungsgemäße Antikörper als Vermittler, weitere Antikörper und Liganden, z. B. toxische Substanzen, an vorstehende Zellen und

Zellgruppen heranzuführen. Die erfindungsgemäßen Antikörper können auch als Carrier für Toxine und toxisch wirksame Substanzen eingesetzt werden. Desweiteren eignen sie sich zum Entfernen von Tumorzellen aus Zellsuspensionen.

Mit der vorliegenden Erfindung sind somit neue diagnostische und therapeutische Maßnahmen bei Carcinomen, insbesondere metastasierenden Carcinomen, möglich.

Die Erfindung wird nun weiter mit Bezug auf die Abbildungen beschrieben:

In der Abbildung 1 sind beispielhaft menschliche Carcinom-Zellen in der Immunfluoreszenzmikroskopie dargestellt, nachdem sie als intakte Zellen fixiert worden sind und mit Antikörpern gegen Cad-ex-Teile von Dsg2 reagiert haben, so in der linken Hälfte eine einzelne Zelle eines Plattenepithel-Carcinoms der Vulva (Linie A-431 der American Type Culture Collection, Katalog-Nr. ATCC CRL 1555) und in der rechten Hälfte ein Zellpaar der Linie PLC eines primären Leberzell-Carcinoms (American Type Culture Collection, Katalog-Nr. ATCC CRL 8024). Die in der Fluoreszenz hell aufleuchtenden Punkte sind die Reaktionsstellen der von außen zugänglichen Cad-ex-Teile des Dsg2 Glykoproteins.

In der Abbildung 2 ist eine solche Reaktionsstelle auf einer intakten Zelle in der Immunelektronenmikroskopie dargestellt, wobei hier eine menschliche Epidermis-Zelle der Linie HaCaT als Beispiel benutzt wurde und die an der Oberfläche gebundenen Antikörper gegen Cad-ex-Teile von Dsg2 mit einem spezifisch gegen die Art dieser Antikörper gerichteten zweiten Antikörper nachgewiesen wurden, der an kolloidale Goldpartikel mit einem Durchmesser von durchschnittlich etwa 10 Nanometer gekoppelt war. Die Gruppe der sechs kontrastreichen Goldpartikel markiert so eine Dsg2-haltige Oberflächenstruktur, die nicht in einem Desmosom vorkommt.

In Abbildung 3 wird beispielhaft das Ergebnis der Immunblot-Analyse der Zellkulturflüssigkeit von menschlichen HaCaT-Zellkulturen dargestellt. Die Proteine

- 9 -

der Zellkulturflüssigkeit wurden elektrophoretisch größenfraktioniert und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Färbung der Membran mit Ponceau-Reagenz zeigt unspezifisch die quantitativ am stärksten vertretenen Proteine der Probe (Abb. 3, a, Spur 2) sowie Größenmarker-Proteine (Abb. 3, a, Spur 2). Die Membran wurde anschließend mit den monoklonalen Antikörpern Dsg2-G11 (Abb. 3, b) beziehungsweise Dsc3-U114 (Abb. 3, c) untersucht. Die spezifischen Antikörper detektieren sowohl für Dsg2 als auch für Dsc3 ein spezifisches, etwa 90kDa großes Molekülfragment der extrazellulären Moleküldomäne.

Die Gewinnung solcher der vorliegenden Erfindung zugrunde liegenden Antikörper wird durch das nachstehende Beispiel erläutert.

Beispiel 1: Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen Cad-ex-Teile von Dsg2

Zur Immunisierung wurden Mäuse des Stammes Balb/c verwendet. Als Antigen wurde ein Dsg2-Polypeptid verwendet, das die vorstehende Aminosäuresequenz II enthielt. Einer Maus wurden dann etwa 100µg Polypeptid, emulgiert in vollständigem Freund's Adjuvans, verabreicht. Es folgten drei "Booster"-Injektionen mit jeweils 100 µg Polypeptid, wobei das Polypeptid in nicht-vollständigem Freund's Adjuvans emulgiert war. Vier Tage vor Entnahme der Milzzellen wurden der Maus 100µg Polypeptid intraperitoneal verabreicht. Die dann entnommenen Milzzellen wurden mit Maus-Myelomzellen des bekannten Stammes X63-Ag8 653 fusioniert. Es wurden monoklonale Antikörper erhalten. Diese wurden mit einzelnen Epithel- und Carcinom-Zellen inkubiert, wodurch jene Antikörper identifiziert wurden, die Cad-ex-Teile von Dsg2 erkennen. Von diesen Antikörpern wurden die mit Dsg2-G11, Dsg2-G91, Dsg2-G96 und Dsg2-G129 bezeichneten Antikörper bei der DSM unter DSM ACC 2226, DSM ACC 2227, DSM ACC 2228 bzw. DSM ACC 2229 am 9. August 1995 hinterlegt. Der Antikörper

- 10 -

Dsg2-G6 wurde bei der DSM unter ACC 2236 am 20. September 1995 hinterlegt.

Patentansprüche

1. Antikörper gegen Teile von desmosomalen Cadherinen, wobei die Teile an der Zelloberfläche auch von nicht durch Desmosomen verbundenen Zellen exponiert sind.
- 5 2. Antikörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die dadurch erkannten Zellen einzelne Epithel-Zellen, einzelne Carcinom-Zellen und/oder kleine Carcinom-Zellgruppen, insbesondere Mikrometastasen, sind.
- 10 3. Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das desmosomale Cadherin das Desmoglein Dsg2 ist.
4. Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das desmosomale Cadherin das Desmocollin Dsc2 ist.
- 15 5. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie polyklonal sind.
6. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie monoklonal sind.
- 20 7. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 - 3 und 5 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß ihr Epitop innerhalb des Molekülabschnitts von Desmoglein Dsg2 liegt, der durch die folgende Aminosäuresequenz bezeichnet ist:

25 AWITAPVALR EGEDLSKKNP IAKIHSDLA EERGLKITYKY TGKGITEPPF
GIFVFNKDTG ELNVTSLDR EETPFFLLTG YALDARGNNV EKPLELRIKV
LDINDNEPVF TQDVFGVSVE ELSAAHTLVM KINATDADEP NTLNSKISYR
IVSLEPAYPP VFYLNKDTGE IYTTSVTLDR EEHSSYTLTV EARDGNGEVT
DKPVKQAQVQ IRILDVNDNI PVVENKVLEG MVEENQVNVE VTRIKVFDAD
30 EIGSDNWLAN FTFASGNEGG YFHIETDAQT NEGIVTLIKE VDYEEMKNLD

- 12 -

FSVIVANKAA FHDSIRSKYK PTPIPIKVKV KNVKEGIHFK SSVISIYVSE
 SMDRSSKGQI IGNFQAFDED TGLPAHARYV KLEDRDNWIS VDSVTSEIKL
 AKLPDFESRY VQNGTYTVKI VAISEDYPRK TITGTVLINV EDINDNCPTL
 IEPVQTICHD AEYVNVTAED LDGHPNSGPF SFSVIDKPPG MAEKWKIARQ
 ESTSVLLQQS EKKLGRSEIQ FLISDNQGFS CPEKQVLTLT VCEVLHGSGC
 REAQHDSYVG

8. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 - 3 und 6 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß er bei der DSM unter einer der folgenden Bezeichnungen DSM ACC 2226, DSM ACC 2227, DSM ACC 2228, DSM ACC 2229 bzw. DSM ACC 2236 hinterlegt ist.

9. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 - 3 und 5 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß ihr Epitop innerhalb des Molekülabschnitts von Desmoglein Dsg2 liegt, der durch die folgende Aminosäuresequenz bezeichnet ist.

INDNEPVFTQDVFGSVEELS AAHTLVMKIN ATDADEPNTL NSKISYRIVS
 LEPAYPPVFY LNKDTGEIYT TSVTLDREEH SSYTLTVEAR DNGEVTDKP
 VKQAQVQIRI LDVNDNIPVV ENKVLEGMVE ENQVNVEVTR IKVFDADIEG
 SDNWLANFTF ASGNEGgyFH IETDAQTNeg IVTLIKEVDY EEMKNLDFSv
 IVANKAAfHK SIRSKYKPTP IPIKVKVKNV KEGIHFKSSV ISIVSESMD
 RSSKGQIIGN FQ

10. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 - 3, 6 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß er bei der DSM unter einer der folgenden Bezeichnungen DSM ACC 2226, DSM ACC 2227, DSM ACC 2228, DSM ACC 2229 bzw. DSM ACC 2236 hinterlegt ist.

11. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 - 2 und 4 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß ihr Epitop in dem Aminosäuresequenz-Bereich von Desmocollin Dsg2 liegt, der mit dem Dekapeptid RWAPICSML beginnt und dem Dekapeptid DCTHRVDPRI endet.

12. Verfahren zur Herstellung von Antikörpern nach Anspruch 1, dadurch

- 13 -

gekennzeichnet, daß Tiere mit einem oder mehreren desmosomalen Cadherinen und/oder Fragmenten davon immunisiert werden, und

(a) polyklonale Antikörper aus den Seren der Tiere erhalten werden, oder

(b) monoklonale Antikörper nach Fusion von Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen erhalten werden, oder

(c) Antikörper mit Hilfe der rekombinanten DNA-Technik hergestellt wurden

(d) die nach (a), (b) oder (c) erhaltenen Antikörper mit nicht durch Desmosomen verbundenen Zellen inkubiert werden, wodurch die entsprechenden Antigene auf der Oberfläche dieser Zellen identifiziert werden.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß zur Immunisierung der Tiere ein Desmoglein Dsg2-Fragment mit folgender Aminosäuresequenz verwendet wird:

AWITAPVALR EGEDLSKKNP IAKIHSDLAE ERGLKITYKY TGKGITEPPF
 GIFVFNKDTG ELNVTSLDR EETPFLLTG YALDARGNNV EKPLELRIKV
 LDINDNEPVF TQDVFGSVE ELSAAHTLVM KINATDADEP NTLNSKISYR
 IVSLEPAYPP VFYLNKDTGE IYTTSVTLDR EEHSSYTLTV EARDGNGEVT
 DKPVKQAQVQ IRILDVNDNI PVVENKVLEG MVEENQVNVE VTRIKVFDAD
 EIGSDNWLAN FTFASGNEGG YFHIETDAQT NEGIVTLIKE VDYEMKNLD
 FSVIVANKAA FHDSIRSKYK PTPIPIKVKV KNVKEGIHFK SSVISIYVSE
 SMDRSSKGQI IGNFQAFDED TGLPAHARYV KLEDRDNWIS VDSVTSEIKL
 AKLPDFESRY VQNGTYTVKI VAISEDYPRK TITGTVLINV EDINDNCPTL
 IEPVQTICHD AEYVNVTAED LDGHPNSGPF SFSVIDKPPG MAEKWKIARQ
 ESTSVLLQQS EKKLGRSEIQ FLISDNQGFS CPEKQVLTLT VCEVLHGSGC
 REAQHDSYVG

- 14 -

14. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß zur Immunisierung der Tiere ein Desmoglein Dsg2-Fragment mit folgender Aminosäuresequenz verwendet wird:

5 INDNEPVFTQDVFGSVEELS AAHTLVMKIN ATDADEPNTL NSKISYRIVS
 LEPAYPPVFY LNKDTGEIYT TSVTLDREEH SSYTLTVEAR DGNGEVTDKP
 VKQAQVQIRI LDVNDNIPVV ENKVLEGMVE ENQVNVEVTR IKVFDADEIG
 SDNWLANFTF ASGNEGGEYFH IETDAQTNEG IVTLIKEVDY EEMKNLDFSV
 10 IVANKAAFHK SIRSKYKPTP IPIKVVKVNV KEGIHFSSV ISIIYVSESMD
 RSSKGQIIGN FQ

15. Verwendung der Antikörper nach einem der Ansprüche 1 - 11 für diagnostische und/oder therapeutische Maßnahmen.

- 15 16. Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die diagnostischen Maßnahmen den Nachweis von nicht durch Desmosomen verbundenen Carcinom-Zellen und kleinen Carcinom-Zellgruppen umfassen.

- 20 17. Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß lebende oder fixierte Carcinom-Zellen durch Anwendung von Zellsortierungsverfahren abgetrennt, angereichert oder diagnostiziert werden.

- 25 18. Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die therapeutischen Maßnahmen das Hinzuführen von weiteren Antikörpern oder Liganden an die bezeichneten Epitope umfassen.

- 30 19. Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die diagnostischen Maßnahmen die klinisch-chemische Detektion von Molekülfragmenten der extrazellulären Domäne desmosomaler Cadherine in Körperflüssigkeiten umfassen.

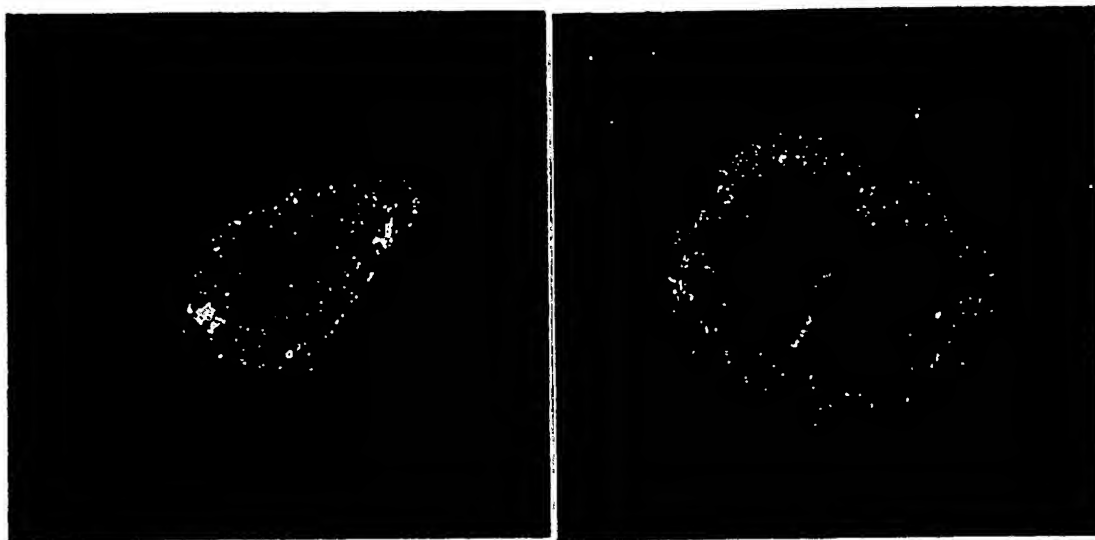


Abb. 1



Abb. 2

3/3

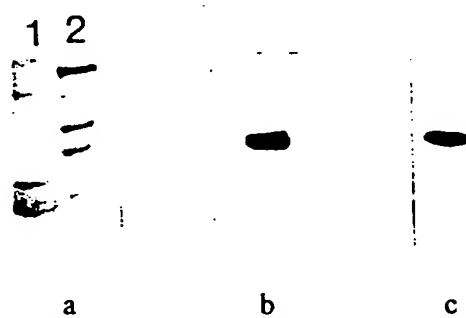


Abb. 3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)